

بررسی فراوانی ائوزینوفیلی بافتی در سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن

دکتر صدیقه رهروتان^۱ دکتر مریم جوله^{۲*} دکتر امیرحسین خطیبی^۳

۱- استادیار بخش آسیب شناسی دهان فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دستیار بخش آسیب شناسی دهان فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دندانپزشک

خلاصه:

سابقه و هدف: ائوزینوفیلی همراه تومور (TATE) در انواع مختلف نئوپلاسم ها مشاهده می شود ولی هنوز ارتباط آن با سرطان ها مشخص نشده است، از جمله سرطان سلول سنگفرشی (SCC) که شایع ترین بدخیمی سر و گردن می باشد. هدف این مطالعه بررسی TATE و درجه بندی هیستولوژیک SCC سر و گردن توسط رنگ آمیزی Luna می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی، ۶۷ نمونه شامل اسلایدهای برشهای ۴ میکرونی بافت HNSCC رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین جهت بررسی درجه بندی هیستولوژیک بازبینی شد و به سه گروه خوب تمایز یافته، با تمایز ضعیف و با تمایز متوسط تقسیم شدند. بررسی انفیلتراسیون ائوزینوفیل ها در تومور با استفاده از روش رنگ آمیزی هیستوشیمی Luna انجام شد، ائوزینوفیل ها در ۱۰ شان میکروسکوپی بصورت تصادفی شمارش شده و در ۴ گروه طبقه بندی شدند. ارتباط بین ارتشاح ائوزینوفیلی و درجه هیستولوژیک و سایر عوامل مرتبط با آزمون های Mann-U-Whitney، Chi-square Kruskal-wallis و ضریب همبستگی Spearman بررسی شد.

یافته ها: فراوانی ائوزینوفیلی بافتی در ۱ مورد صفر (۰/۵٪) و در ۶۶ مورد (۹۸/۵٪) مثبت بود. میزان سلول های ائوزینوفیل شمارش شده $4/74 \pm 5/41$ بود. بین درجه هیستوپاتولوژیک و TATE رابطه معنی دار بدست آمد. ($p = 0/04$) ولی رابطه ی معنا داری بین TATE با سن، جنس و محل ضایعه وجود نداشت.

نتیجه گیری: فراوانی ائوزینوفیلی بافتی در گروه مبتلایان به اسکواموس سل کارسینوم سر و گردن با تمایز ضعیف کمتر از دو گروه دیگر بود ولی ارتباطی با سایر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک دیده نشد.

کلید واژه ها: ائوزینوفیلیها، سرطان سلول سنگفرشی، سر و گردن، رنگ آمیزی Luna

وصول مقاله: ۹۲/۷/۲۰ اصلاح نهایی: ۹۳/۱/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۳/۱/۳۱

مقدمه:

مرحله پیشرفت تومور (Stage) در SCC دهان در زمان تشخیص مهم ترین عامل پیش آگهی است که با استفاده از سیستم TNM تعیین می شود. این سیستم سه خصوصیت کلینیکی بنیادی، اندازه تومور، متاستاز به لنف نود و متاستاز دور دست را شامل می شود. در نهایت با تجمیع این پارامترها Stage بیمار مشخص می شود. بدین صورت که هرچه تومور اولیه کوچکتر باشد و هیچ مدرکی از درگیری غدد لنفاوی منطقه ای و متاستاز دور دست وجود نداشته باشد پیش آگهی بهتر خواهد بود و بالعکس^(۲،۳) مطالعات انجام گرفته در زمینه کارسینوم دهانی، فاکتورهای بالینی و آناتومیک مختلفی از

اسکواموس سل کارسینوم (SCC) شایع ترین بدخیمی سر و گردن و حفره ی دهان منشا گرفته از اپی تلیوم سنگفرشی مطابق مخاطی است، به طوری که بیش از ۹۰ درصد سرطان های حفره ی دهان را شامل می شود. مشخصه آن، اتیوپاتوژنز چند عاملی و چند مرحله ای است.^(۱)

در ۳۰ سال گذشته، با وجود پیشرفت در تکنیک های تشخیصی و روش های درمانی بروز و شیوع SCC دهانی به ویژه در افراد جوانتر در حال افزایش است.^(۲)

بتوان از ایمونوترابی به کمک واکنش آنتی تومورال ائوزینوفیل ها در درمان سرطان کمک گرفت.^(۲۰) توجه به توضیحات فوق در رابطه با عدم هماهنگی نتایج پژوهش‌ها، برآن شدیم به بررسی حضور ائوزینوفیل ها در SCC سر و گردن بپردازیم. لازم به ذکر است در این مطالعه از بین روشهای مختلف رنگ آمیزی هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی (IHC)، رنگ آمیزی هیستوشیمیایی Luna، استفاده شده است. در این رنگ آمیزی، گرانولهای موجود در ائوزینوفیل ها به خوبی به رنگ قرمز درآمده و در زمینه آبی رنگ متضاد زیرین به وضوح قابل مشاهده اند. این رنگ آمیزی اختصاصی ائوزینوفیل جهت سهولت تشخیص این سلولها در بافت عمومیت دارد.^(۲۱،۲۲) در نهایت باید خاطر نشان کرد هدف ما در این مطالعه تعیین وضعیت ائوزینوفیلی بافتی در مبتلایان به SCC ناحیه سر و گردن توسط رنگ آمیزی Luna و بررسی ارتباط آن با درجه تمایز هیستولوژیک تومور و خصوصیات کلینیکوپاتولوژیک آن است.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی ۱۰۷ پرونده ی مربوط به بیماران مبتلا به SCC سر و گردن (حفره دهان- حلق- حنجره و لب) بررسی شدند و از این تعداد مواردی که در راستای معیارهای زیر بودند، انتخاب شدند.

- (۱) ضایعه فقط به روش جراحی درمان شده باشد.
- (۲) ضایعه به صورت اولیه بوده و عودی گزارش نشده باشد
- (۳) بیمار سابقه رادیوتراپی و شیمی درمانی نداشته باشد و
- (۴) اطلاعات بیمار بطور کامل در دسترس باشد.

از نمونه های مورد نظر برشهای بافتی ۴ میکرونی تهیه و اسلایدهای هماتوکسیلین ائوزین (H&E) از نظر درجه تمایز تومور، بر اساس معیار Broder، طبقه بندی شدند.^(۳) بعد از تأیید تشخیص و طبقه بندی تومورها، بلوکهای پارافینه مربوطه جهت تهیه اسلاید و رنگ آمیزی Luna برش خورده و اسلاید تهیه گردید. ۶۷ اسلاید نهایی جهت شمارش ائوزینوفیل ها بررسی شدند. جهت بررسی رنگ پذیری سلولهای ائوزینوفیل از

جمله محل آناتومیک تومور وسعت تومور، stage تومور اولیه، درجه ی تمایز هیستولوژیک، ضخامت تومور و تهاجم به عروق و اعصاب را با ریسک متاستاز به لنف نودها و میزان بقا مرتبط دانسته اند.^(۳،۴) یکی از عوامل بررسی شده در ارتباط با احتمال متاستاز به گره های لنفاوی گردنی و موثر بر پیش آگهی بیمار مبتلا به OSCC، سلولهای التهابی به خصوص ائوزینوفیل ها هستند.^(۴) ارتشاح التهابی در زمینه بافت تومورال را سلولهای تک هسته ای و به میزان کمتر نوتروفیل ها و ائوزینوفیل ها تشکیل می دهند.^(۵،۶) ائوزینوفیل ها از مغز استخوان منشأ می گیرند و ۳-۱۰ درصد لکوسیت های خون محیطی را شامل می شوند.^(۷) ویژگی برجسته این سلولها، حضور گسترده گرانولهای اختصاصی کروی و بیضی شکل، حاوی پروتئین بازی اصلی، نورو توکسین مشتق از ائوزینوفیل، پراکسیداز ائوزینوفیل و پروتئین کاتیونیک ائوزینوفیل است که به شدت با ائوزین رنگ گرفته و در سیتوپلاسم سلول قرار دارند و در زیر میکروسکوپ نوری، هسته ی دو لوبه آن به طور مشخص دیده می شود.^(۸) لازم به ذکر است که ائوزینوفیل توانایی ساخت و ترشح مدياتورهای التهابی مثل GM-CSF اینترلوکین ۳ و ۵ TNF TGF- TGF- را دارند که برخی از این عوامل می توانند باعث لیز سلولهایی همانند سلولهای تومورال شوند.^(۹،۱۰)

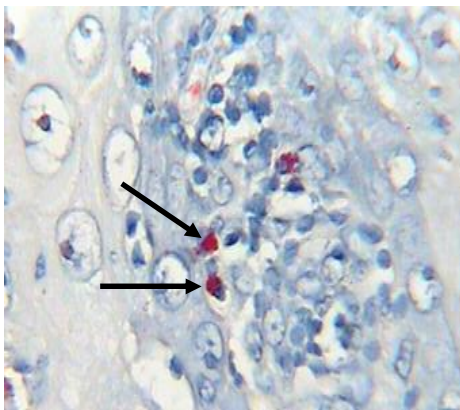
(Tumor associated tissue eosinophilia) یا TATE به معنی ارتشاح سلولهای التهابی با اکثریت ائوزینوفیل ها در اطراف و یا داخل تومور است که این ارتشاح التهابی در بسیاری از نواحی مانند حلق حنجره ریه، معده و دهان مطرح گشته است.^(۱۳-۹،۱۱)

مطالعات بسیاری به بررسی وضعیت ائوزینوفیلی بافتی مرتبط با تومور یا TATE و ارتباط آن با پروگنوز و میزان بقای بیماران مبتلا پرداخته اند^(۱۶-۱۲)، اما یافته های متناقضی درباره ارتباط بین ارتشاح ائوزینوفیل ها با فاکتورهای کلینیکال، پاتولوژیک و پیش آگهی SCC سر و گردن عنوان شده است.^(۱۴-۱۹) اگرچه اغلب مطالعات حاکی از آن بودند که TATE نشانگر پروگنوستیک مطلوبی است، پس شاید به عنوان نظریه در آینده

جهت بررسی ارتباط TATE با یافته‌های کلینیکی پاتولوژیک از آزمون کای دو و من ویتنی استفاده شد. در تمامی موارد P-value کم تر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

از ۶۷ نمونه HNSCC وارد شده در مطالعه ۴۱ نفر (۶۱/۲٪) مرد و در سنین (۵۶/۶±۱۳/۱) و ۲۶ زن (۳۸/۸٪) با سنین (۶۲±۱۴/۷) سال وجود داشتند. بیشترین فراوانی در گروه سنی ۵۹-۴۵ سال با ۳۲ مورد (۴۷/۸٪) بود. مسن ترین فرد ۹۰ سال و جوان ترین ۳۶ سال سن داشتند. شایع ترین محل درگیری زبان و فارنکس کمترین ناحیه درگیر مربوط به لارنکس بود. تمام نمونه‌ها از لحاظ درجه بندی هیستولوژیک (Grading) در سه گروه خوب ۲۵ مورد (۳۷/۳٪)، متوسط ۳۰ مورد (۴۴/۸٪) و ضعیف ۱۲ مورد (۱۷/۹٪) دسته بندی شدند. میانگین تعداد ائوزینوفیل‌های مشاهده شده در هر نمونه در شان‌های مورد بررسی ۵/۴۱±۴/۷۴ بود (شکل ۱).



شکل ۱- سرطان سلول سنگفرشی دهان ائوزینوفیل (فلش) رنگ آمیزی Luna بزرگنمایی ۴۰۰×

توزیع نمونه‌ها بر حسب شدت ائوزینوفیلی و به تفکیک عوامل مرتبط در جدول یک ارائه گردید و نشان می‌دهد که مجموع

نمونه پولیپ بینی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از بلوکهای پارافینه انتخاب شده ی دارای بافت تومورال مناسب توسط دستگاه میکروتوم مدل Leitz آلمان، برشهای ۴ میکرونی جهت رنگ آمیزی هیستوشیمیایی تهیه شد. مقاطع بدست آمده روی آب الکل منتقل شدند تا چروکهای ایجاد شده در بافت از بین برود، سپس نوار برش خورده بر روی آب ولرم (بین ۴۸-۴۵ سانتی گراد) منتقل شدند و برشهای مناسب توسط لام آغشته به چسب آلومین از روی آب برداشته شد. برشهایی که روی لام گسترده شدند با احتیاط آب گیری شده و سپس در یک اتوکلاو ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت قرار داده شدند تا پارافین حل شده و بافت به خوبی به لام بچسبد، سپس برای زدودن پارافین بافت آنها را به مدت ۲۰ دقیقه داخل گزبلول قرار گرفت. جهت رنگ آمیزی Luna، لام‌ها برش خورده و پارافین زدایی شدند. ابتدا لامها با محلول هماتوکسیلین و بریچ اسکارلت به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس با محلول اسید الکل ۱ درصد (اسید کلریدریک) مجدداً با آب شسته شدند. در مرحله بعد با محلول لیتیوم کربنات و سپس به مدت ۲ دقیقه با آب جاری شستشو انجام شد.^(۱۲) در نهایت جهت دهیدراته کردن، از الکل ۹۵ درجه و الکل خالص استفاده گردید و در نهایت برروی اسلایدها، لامل چسبانده شد. روش شمارش ائوزینوفیل‌ها در بافت همبندی داخل تومور به صورتی بود که با میکروسکوپ نوری Olympus (Japan) به صورت تصادفی ۱۰ ناحیه در داخل تومور انتخاب شد و با بزرگنمایی ۴۰۰ تعداد سلولهای ائوزینوفیل در هر ناحیه شمارش شده و مجموع آنها در این نواحی در ۴ دسته تقسیم بندی شدند.^(۲۳)

عدم مشاهده ائوزینوفیل: صفر

مشاهده ۱-۴ عدد ائوزینوفیل: ارتشاح ضعیف

مشاهده ۵-۱۹ عدد ائوزینوفیل: ارتشاح متوسط

مشاهده ۲۰ عدد و بیشتر: ارتشاح شدید

جهت آنالیز نتایج به دست آمده اطلاعات با استفاده از نسخه ۱۹ نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری Kruskal-wallis و ضریب همبستگی Spearman مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

صفر: ۱ مورد (۲/۵٪) ارتشاح ضعیف: ۳ مورد (۴/۵٪) ارتشاح متوسط: ۱۴ مورد (۲۰/۹٪) و با شماره ارتشاح شدید: ۴۹ مورد (۷۳/۱ درصد) (جدول ۱). با آزمون Kruskal-wallis رابطه‌ی معنوی دار بین درجات مختلف هیستوپاتولوژیک و تعداد ائوزینوفیل‌ها وجود داشت ($P=۰/۰۴$) که نشان دهنده‌ی این مطلب است که هر چه میزان تمایز تومور کمتر باشد تجمع ائوزینوفیل‌ها کاهش می‌یابد و بین ائوزینوفیلی با سایر عوامل مرتبط مثل سن، محل سرطان و جنس بیمار ارتباطی وجود نداشت.

جدول ۱- فراوانی ائوزینوفیلی بافتی (TATE) در اسکواموس سل کارسینوم سر و گردن به تفکیک عوامل مرتبط

ارتشاح ائوزینوفیل‌ها	صفر	ضعیف	متوسط	شدید	جمع	P.Value
درجه هیستوپاتولوژیک (میزان تمایز)	خوب	۰	۰	۲۱ (۳۱/۳۴)	۲۵ (۳۷/۳۰)	*۰/۰۴
	متوسط	۱ (۱/۴۹)	۱ (۱/۴۹)	۲۳ (۳۴/۳۲)	۳۰ (۴۴/۷۷)	
	ضعیف	۰	۲ (۲/۹۸)	۵ (۷/۴۶)	۱۲ (۱۷/۹۱)	
سن	۳۰-۴۴	۰	۱ (۱/۴۹)	۲ (۲/۹۸)	۶ (۸/۹۵)	۰/۲۸
	۴۵-۵۹	۰	۲ (۲/۹۸)	۹ (۱۳/۴۳)	۳۲ (۴۷/۷۶)	
	۶۰-۷۴	۱ (۱/۴۹)	۰	۱۳ (۱۹/۴۰)	۱۴ (۲۰/۸۹)	
	۷۵-۹۰	۰	۰	۳ (۴/۴۷)	۱۲ (۱۷/۹۱)	
محل	زبان	۰	۰	۳ (۴/۴۷)	۱۴ (۲۰/۸۹)	۰/۴۵
	کف دهان	۰	۰	۰	۴ (۵/۹۷)	
	لب	۰	۰	۲ (۲/۹۸)	۱۰ (۱۴/۹۲)	
	فارنکس	۰	۱ (۱/۴۹)	۴ (۵/۹۷)	۷ (۱۰/۴۴)	
	لارنکس	۱ (۱/۴۹)	۱ (۱/۴۹)	۴ (۵/۹۷)	۱۱ (۱۶/۴۱)	
	گلوت	۰	۱ (۱/۴۹)	۱ (۱/۴۹)	۲ (۲/۹۸)	
	سایرنواحی	۰	۱ (۱/۴۹)	۰	۳ (۴/۴۷)	
جنس	مرد	۱ (۱/۴۹)	۳ (۴/۴۷)	۹ (۱۳/۴۳)	۲۸ (۴۱/۷۹)	۰/۰۷
	زن	۰	۰	۵ (۷/۴۶)	۲۶ (۳۸/۸)	

بحث:

سیر سرطان از جمله OSCC بستگی به فاکتورهای متعدد از جمله پاسخ ایمنی میزبان در برابر تومور دارد و یکی از سلولهای شایع در ارتشاح التهابی علیه سلولهای تومورال، ائوزینوفیل ها هستند. این سلولها با تولید پروتئین های سیتوتوکسیک مانند پروتئین بازی اصلی و پروتئین کاتیونیک ائوزینوفیل و فعال کردن سیستم ایمنی از طریق آزادسازی برخی اینترلوکین ها از جمله اینترلوکین ۵ و ۴ و ۲ منجر به تقویت سیستم ایمنی و مقابله با تومور می شود در حالیکه با رها سازی اینترلوکین ۱۰ و TGF- منجر به پیشرفت تومور می شود.^(۱۲،۲۴) در نتایج این مطالعه همانطور که قبلا ذکر شد رابطه ی معنی دار بین درجه تمایز هیستولوژیک و TATE وجود داشت به این معنی که هرچه درجه تمایز هیستولوژیک تومور کمتر باشد از میزان TATE کاسته می شود که این نتایج بیشتر تائید کننده نقش ضد تومورال ائوزینوفیل هاست.^(۱۹) با این وجود بسیاری از مقالات نتایج متفاوت را گزارش کرده اند. به طور مثال Leighton به بررسی ارتباط TATE و تاثیرگذاری آن روی کارسینوم نازوفارنکس پرداخت . در این مطالعه TATE براساس تعداد ائوزینوفیل های موجود به سه گروه خفیف (<۱۰)، متوسط (۱۰۰-۱۰) و شدید (>۱۰۰) تقسیم شد . در نهایت یافته ها بیانگر عدم ارتباط TATE با عوامل دخیل در پیش آگهی تومور بود.^(۲۵) در صورتی که همانطور که قبلا گفته شد ما از طبقه بندی دیگری برای شمارش تعداد ائوزینوفیل ها استفاده کردیم که می تواند بر روی نتایج اثرگذار باشد. در مطالعه Tadbir ، نقش TATE به عنوان یک فاکتور تعیین پیش آگهی در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی شد و بین TATE و تمایز تومور رابطه آماری معنی داری یافت نشد.^(۲۶) هم چنین در دو تحقیق Goldsmith و همکاران در سالهای ۱۹۸۷ و ۱۹۹۲ بررسی روی ائوزینوفیل ها و TATE در بدخیمی سر و گردن نشان داد که ائوزینوفیل ها با پیش آگهی مطلوب بیمار مرتبط می باشند البته ارتباط TATE با درجه بافت شناختی تومور در این تحقیق بررسی نشد.^(۱۸،۱۷) شاید علت تناقض در نتایج، به دلیل

تفاوت در روش شمارش ائوزینوفیل ها روش رنگ آمیزی و نحوه تقسیم بندی تعداد ائوزینوفیل ها در بافت باشد. در تمام مطالعات فوق روش رنگ آمیزی H&E بوده و هیچ روش رنگ آمیزی حساستری برای بررسی ائوزینوفیل ها استفاده نشده است. اما در بعضی از مطالعات به علت مورفولوژی غیر عادی و ناشایع گرانولوسیتها بخصوص ائوزینوفیل ها در بافتهای فیبروز و همچنین به علت ارتشاح التهابی شدید در نمونه و تشخیص دشوار این سلولها روی لام از روشهای دیگری از جمله اتوفلورسنس یا روشهای غیر هیستوشیمی برای تشخیص ائوزینوفیل های سالم و یا دگرانوله در تومور استفاده شده است.^(۲۷) برای مثال در مطالعه Joshi و همکاران از رنگ آمیزی Congo red برای تشخیص ائوزینوفیل ها استفاده شد که نسبت به رنگ آمیزی H&E به طور معنی داری در تشخیص این سلولها موثر بوده است.^(۲۴) یا در تحقیق Lorena و همکاران نیز یافته ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنی دار بین تعداد میانگین ائوزینوفیل های تشخیص داده شده در میلی متر مربع بوسیله رنگ آمیزی H&E و IHC در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود. اگرچه بیان شد در هنگام استفاده از آنتی بادی مونوکلونال CD15 ، این آنتی بادی فقط با یک اپی توپ روی مولکول واکنش می دهد که منجر به واکنش آنتی بادی ها با آنتی ژنها به تعداد محدود می شود و میزان ائوزینوفیل تشخیص داده شده توسط IHC کمتر از H&E است.^(۲۷) همچنین Alkhabuli و همکاران در بررسی تاثیر آئزیوژنز و سلولهای ایمنی روی کارسینوم سلول سنگفرشی زبان از روش Carbol chromotrope استفاده کرد و نتایج بیانگر عدم ارتباط میان تراکم ائوزینوفیل و درجه بافت شناختی تومور بود.^(۱۲) ما در این مطالعه جهت تسریع و افزایش دقت خواندن اسلاید ها، از رنگ آمیزی هیستوشیمی Luna که نسبتا کم هزینه و در دسترس تر از دیگر روش های شناخته شده است و به صورت انتخابی سلولهای ائوزینوفیل را مشخص می کند، استفاده کردیم.^(۲۱) که این تفاوت روش رنگ آمیزی می تواند از عوامل نتایج متفاوت با سایر مطالعات باشد. همانطور که در این مطالعه ذکر

مطرح شده از جمله محل وقوع تومور و سایر عوامل تکنیکی است.^(۲۳،۱۲) نکته ی جدیدی که در مطالعه ما وجود دارد استفاده از رنگ آمیزی Luna است. از محدودیت های مطالعه ما عدم دسترسی کافی به اطلاعات پرونده بیماران موجود جهت بررسی موارد عود، میزان بقا و متاستاز بود.

نتیجه گیری و پیشنهادات:

به نظر می رسد با کاهش تمایز سلول های سرطانی در SCC سر و گردن میزان اتوزینوفیلی بافتی به طور معنی داری کاهش می یابد.

شد بین TATE و فاکتورهای بررسی شده از جمله جنس و محل تومور رابطه معنی داری یافت نشد که این نتایج همراستا با نتایج مطالعه Olivera و همکاران در سال ۲۰۱۲ بود که نشان داد هیچ ارتباط معنی داری بین TATE و جنس، نژاد، محل تومور و stage یافت نمی شود و تومورهایی با TATE بالاتر و شدیدتر به صورت معنی داری با سابقه مصرف الکل و سیگار مرتبط بودند.^(۲۸) در مطالعات متعددی که در بالا به آنها اشاره شد نتایج متفاوتی در SCC های سر و گردن بدست آمد و هنوز نتایج قطعی در مورد میزان حضور اتوزینوفیل ها در SCC سر و گردن مطرح نیست. تفاوت در مطالعات به دلایل

References

- 1-LO Muzio L, Santarelli A, Panzarella V, Campisi G, Carell M, Ciavarella D, et al. Oral squamous cell carcinoma and biological markers: an update on the molecules mainly involved in oral carcinogenesis. *Minerva stomatol* 2007; 56(6): 341-7
- 2- Feller L, Lemmer J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *J Cancer Ther* 2012; 3:263-68.
- 3-Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & maxillofacial pathology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2009. Chapter:10.
- 4-Amouian S, Tayebi Meybodi N, Ataranzadeh A, Montazer M, Rahimi M. Survey the Association between Tissue Eosinophil Counts and Prognostic Factors of Esophageal SCC. *Gilan University of medical science* 2010; 19(73):55-60
- 5- Martinez-Gimeno C, Rodriguez EM, Vila CN, Varela CL. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic scoring system for evaluating risk of cervical lymph node metastasis. *Laryngoscope* 1995;105:728-733.
- 6- Davoine F, Sim A, Tang C, Fisher S, Ethier C, Puttaguna L, et al. Eosinophils in human oral squamous carcinoma; role of prostaglandin D2. *J Inflamm (Lond)* 2013;10(1):4
- 7- Rothenberg E, Epthtein H. Mechanism of disease. *new Engl J Med*. 1998;328(22):1592-1600.
- 8- Waseem S, Ahmed B, Mazhar H, Aslam M. Eosinophils and eosinophil products in asthma. *J oral pathol* Moo2003;32:9-195.
- 9- Dorta RG1, Lerman G, Kowalski LP, Lauris JR, Latorre MR, Oliveira DT. Tumor-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 2002;41(2):152-7
- 10- Martinelli-Klay CP, Mendis BRRN, Lombardi T. Eosinophils and oral squamous cell carcinoma: a short review. *J Oncol* 2009;2009:310132
- 11- Altemani AM, Guimaraes P, Metze K, Queiroz LS. Quantification analysis of modes of invasion and lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *Neoplasma* 1999;46(5):323-8
- 12- Alkhabuli JO. Significance of neo-angiogenesis and immuno-surveillance cells in squamous cell carcinoma of the tongue. *Libyan J Med* 2007;2(1):30-9
- 13- Falconieri G, Luna MA, Pizzolitto S, DeMaglio G, Angione V, Rocco M. Eosinophil-rich squamous carcinoma of the oral cavity: A study of 13 cases and delineation of a possible new microscopic entity. *Ann Diagn Pathol* 2008;12(5):322-7.
- 14- Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS. Tumor-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol* 1981;34(12):1343-8.
- 15- Gao J, He Y, Wu L. The clinical analysis of eosinophil infiltration in human squamous cell carcinoma of buccal mucosa. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1997; 15(3):228-9,232
- 16- Deron P, Goossens A, Halama AR. Tumor-associated tissue eosinophilia in head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Rolat Spec* 1996;58(3):167-70.
- 17- Goldsmith MM, Cresson DH, Askin FB. The prognostic significance of stromal eosinophilia in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;96:319-24
- 18- Goldsmith MM, Belchis DA, Cresson DH, Merritt WD, Askin FB. The importance of eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;106(1):27-33.
- 19- Dehta P, Mohan debta F, Chaudhary M, Dani A. Evaluation of infiltration of immunological cells (Tumor associated tissue eosinophils and mast cells) in oral squamous cell carcinoma by using special stains. *British journal of medicine & medical research* 2012;2(1):75-85.
- 20- Costello R, O' Callaghan T, Sebahoun G. Eosinophils and antitumor response. *Rev Med Interne* 2005;26(6):479-84.
- 21- Ono Y1, Fujii M, Kameyama K, Otani Y, Sakurai Y, Kanazaki J. xpression of matrix metalloproteinase-1 mRNA related to eosinophilia and interleukin-5 gene expression in head and neck tumor tissue. *Virchows Arch* 1997;431(5):305-10.
- 22- Tomasi VH, Pe'res MA, Itoiz ME. Modification of Luna's technique for staining eosinophils in the hamster cheek pouch. *Biotech Histochem* 2008;83(3-4):147-51.
- 23- Said M, Wiseman S, Yang J, Alrawi S, Douglas W, Cheney R, et al. Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms. *BMC Clin Pathol* 2005;5(1):1
- 24- Joshi PS, Kaijkar MS. A histochemical study of tissue eosinophilia in oral squamous cell carcinoma using congo red staining. *Dent Res J (Isfahan)* 2013;10(6):784-9.

- 25- Leighton SE, Teo JG, Leung SF, Cheung AY, Lee JC, Van Hasselt CA. Prevalence and prognostic significance of tumor-associated tissue eosinophilia in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1996;77(3):436-40.
- 26- Tadbir AA, Ashraf MJ, Sardari Y. Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in oral squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 2009;20(2):287-9
- 27- Lorena SC, Dorta RG, Landman G, Nonogaki S, Oliveira DT. Morphometric analysis of the tumor associated tissue eosinophilia in the oral squamous cell carcinoma using different staining techniques. *Histol Histopathol* 2003;18(3):709-13.
- 28- Oliveira DT, Biassi TP, Faustino SE, Carvalho AL, Landman G, Kowalski LP. Eosinophils may predict occult lymph node metastasis in early oral cancer. *Clin Oral Investig* 2012;16(6):1523-8